

Introduction

Pourquoi l'amidon ?

- source d'énergie renouvelable, peu onéreuse, ubiquiste
- domaines principaux d'application : alimentations humaine et animale → importance de la maîtrise de la variabilité qualitative de cette matière première et de ses produits dérivés.

Pourquoi la SSIV ?

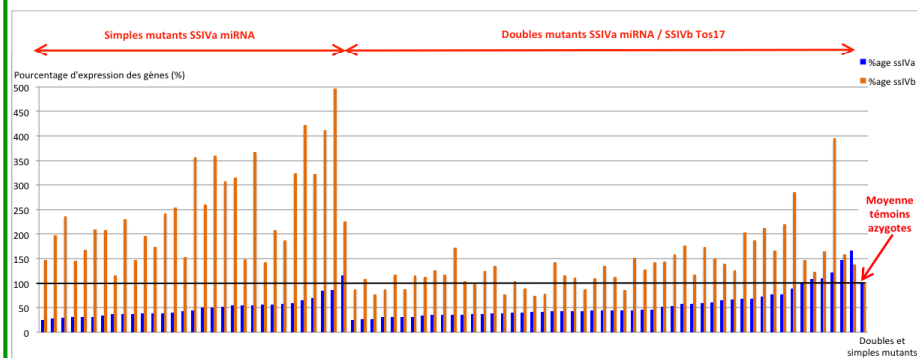
- étude de génétique inverse chez *Arabidopsis thaliana* : analyse de lignées mutantes avec une insertion dans le gène de l'amidon-synthétase soluble de type IV (SSIV)
- sa fonction est liée à un **contrôle du nombre et de la taille des grains d'amidon par chloroplaste**.

Objectif : confirmer ces résultats sur les amyloplastides de l'albumen des grains

- d'une plante de grande culture au génome séquencé, avec des banques de mutants disponibles
- et une population de grains d'amidon de réserve suffisamment monodisperse pour analyser de façon certaine les conséquences de la mutation sur l'effet taille, nombre des grains d'amidon par plaste.
- le riz remplit ces critères.

Résultats

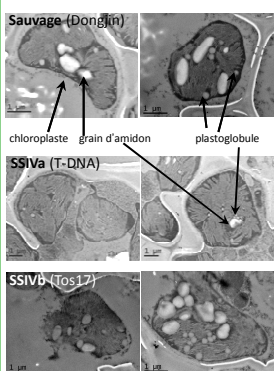
Niveaux d'expression des gènes *ssIVa* et *ssIVb* chez les mutants ARN interférent



Niveaux de transcription des gènes *ssIVa* et *ssIVb* normalisés par rapport au témoin (100%) dans les feuilles des mutants *SSIVa* miRNA et des doubles mutants *SSIVa* miRNA/*SSIVb* Tos17.

- L'ARNi provoque une **forte diminution de l'expression du gène *ssIVa*** chez la majorité des mutants miRNA.
- Le gène ***ssIVb* reste fortement exprimé** chez les doubles mutants et est surexprimé par rapport au témoin chez le simple mutant *SSIVa* miRNA
- Conclusion : les gènes *ssIV* sont difficiles à éteindre complètement.** La redondance fonctionnelle probable entre les formes d'une même enzyme (*SSIVa* vs *SSIVb*) et la prégnance de cette classe de gènes soulignent son importance pour la plante.

Observation de coupes de feuilles au microscope électronique à transmission



La mutation de ***ssIVa*** conduit à une **forte diminution du nombre de grains d'amidon** par chloroplaste.

La mutation de ***ssIVb*** conduit à une **forte augmentation de la taille et du nombre des grains d'amidon**.

Conclusion :

chez *Arabidopsis*, la mutation du gène *ssIV* provoque une diminution du nombre de grains d'amidon et une augmentation de leur taille.

La transposition au riz (qui possède 2 gènes *ssIV*) des résultats obtenus chez *Arabidopsis* n'est pas directe, elle nécessite des analyses complémentaires.

Conclusion

- Les premiers résultats que nous avons obtenus montrent que malgré la difficulté d'éteindre complètement l'expression du gène *ssIV*, nous avons réussi à créer des mutants de ce gène qui présentent des phénotypes contrastés.
- Par ailleurs, nous avons pu constater que les résultats obtenus chez *Arabidopsis*, s'ils donnent des pistes quant aux fonctions des gènes candidats étudiés, ne sont pas pour autant directement transposables au riz. Ce dernier est un meilleur modèle pour la biosynthèse de l'amidon, car il en produit dans les feuilles mais également dans les organes de stockage, ce qui permet la comparaison entre chloro- et amyloplastides, chose impossible chez *Arabidopsis*.

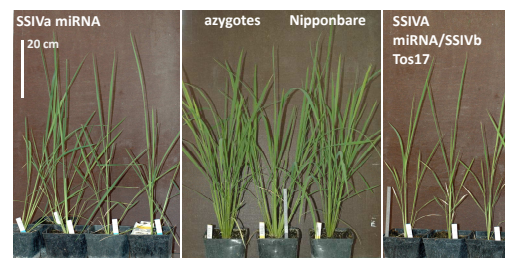
Matériel

4 mutants + leurs témoins azygotes et sauvages correspondants

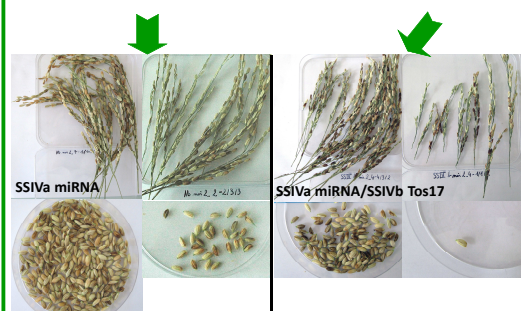
Nom du mutant	Fonds génétique	Type de mutation
SSIVa T-DNA	Dongjin	insertion T-DNA
SSIVb Tos17	Nipponbare	insertion Tos17
SSIVa miRNA	Nipponbare	miRNA
SSIVa miRNA/SSIVb Tos17	Nipponbare	miRNA/insertion Tos17

Ces mutants seront caractérisés à différentes échelles : **phénotypage** de la plante entière, observation au microscope des granules d'amidon dans les chloro- et amyloplastides, analyse du **niveau d'expression des gènes** dans les feuilles et les grains...

Caractérisation des mutants ARN interférent à l'échelle plante



- doubles mutants plus chétifs que simples mutants, eux-mêmes un peu plus chétifs que les témoins



Comparaison des mutants *SSIVa* miRNA et des doubles mutants *SSIVa* miRNA/*SSIVb* Tos17 aux échelles panicules et grains matures pleins.

	Ratio moyen grains pleins/grains totaux (% ± écart-type)	PMG moyen (g)
Nipponbare	N.D.	23,6
SSIVa miRNA	18,7 ± 15,3 (varie entre 0 et 45,7 %)	21,6
SSIVa miRNA/SSIVb Tos17	3,2 ± 4,5 (varie entre 0 et 15,9 %)	18,0

Comparaison du rendement du témoin sauvage, des mutants *SSIVa* miRNA et des doubles mutants *SSIVa* miRNA/*SSIVb* Tos17 (PMG : poids de mille grains ; N.D. : valeur non disponible).

- doubles mutants globalement moins fertiles que simples mutants, fertilité très différente pour un même type de mutant
- PMG plus faible chez le double que chez le simple mutant et chez le simple mutant que chez le sauvage.
- Conclusion : nous avons réussi à créer des types de mutants qui diffèrent visiblement entre eux en taille et en fertilité, même s'il subsiste des variations intra-type de mutants importantes pour ces paramètres.**

Perspectives

Afin d'établir des liens entre structures observées et fonctions des enzymes dont les gènes ont été mutés, nous réaliserons dans les grains en cours de développement et dans les feuilles :

- une analyse fine de la **structure des grains d'amidon** par microscopie
- des études de métabolomique pour suivre les **modifications de la composition biochimique des grains**
- des études de transcriptomique pour **identifier d'autres gènes d'intérêt et des phénomènes éventuels de compensation**.